Università degli Studi “Magna Græcia” di Catanzaro

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Azienda Ospedaliera “Mater Domini”

U.O. Malattie del metabolismo

*Direttore: Prof. Agostino Gnasso*

protocollo Di ricerca clinica

1. **Introduzione**

Le alterazioni emoreologiche e dei suoi principali determinanti, quali l’ematocrito, le proteine plasmatiche (fibrinogeno e globuline), la deformabilità eritrocitaria e l’aggregazione eritrocitaria, si associano a modifiche metaboliche ed emodinamiche. Le anomalie di queste variabili correlano con il marcato aumento sia della viscosità plasmatica che della viscosità del sangue intero (WBV, whole blood viscosity). Da un punto di vista metabolico, tali alterazioni si verificano sia in stati patologici conclamati come il Diabete Mellito, sia in condizioni apparentemente normali, come il prediabete. Nel Diabete Mellito sono state descritte alterazioni emoreologiche (1) e diversi studi hanno documentato che la viscosità ematica è aumentata nei pazienti diabetici (2-4). Non solo, un grande studio prospettico ha dimostrato che la viscosità ematica e l’ematocrito sono fattori di rischio per il Diabete Mellito di tipo 2: i soggetti nei quartili più alti di viscosità ematica avevano un 60 % di probabilità in più di sviluppare il Diabete rispetto alle loro controparti dei quartili più bassi (5). I meccanismi fisiopatologici sono molteplici, molti di questi ancora misconosciuti. Sono state postulate diverse ipotesi in merito. In accordo con la legge di Poiseuille (6), l'elevata viscositàematica è inversamente proporzionale al flusso e pertantopuò predisporre all'insulino-resistenza e al Diabete Mellito di tipo 2 grazie alla limitazione del trasporto di glucosio, insulina e ossigeno ai tessuti metabolicamente attivi (7-10). Inoltre, l'aumento dell'osmolarità in seguito ad iperglicemia provoca un aumento della permeabilità capillare e, di conseguenza, un aumento dell'ematocrito e della viscosità (11). Anche la diuresi osmotica, conseguenza dell’iperglicemia, potrebbe contribuire a ridurre il volume plasmatico e quindi ad aumentare l’ematocrito (12). Tali alterazioni emoreologiche tuttavia sono state documentate anche in soggetti apparentemente normali. Un recente studio infatti ha dimostrato che esiste un rapporto diretto tra viscosità ematica e glicemia anche in soggetti non diabetici: nell’ambito di valori di glicemia considerati normali, gli individui con i livelli di glicemia più elevati avevano incrementi della viscosità ematica paragonabili a quelli osservati nei soggetti con prediabete (13). È necessario puntualizzare che attualmente non esistono farmaci in grado di modificare in maniera rilevante la viscosità ematica e pochi studi d’intervento hanno valutato gli effetti di variazioni acute della viscosità ematica sul profilo metabolico e sulla funzione endoteliale. Un modello semplice e riproducibile di riduzione della viscosità ematica è la donazione di sangue intero. A tal proposito, un recente studio ha dimostrato come, in soggetti perfettamente normali, una riduzione “acuta” della viscosità ematica ottenuta mediante donazione di sangue, non determina modifiche dell’insulino-sensibilità misurata sia direttamente (attraverso il clam peuglicemico-iperinsulinemico), che indirettamente (attraverso l’indice HOMA) (14). In questi stessi soggetti, è stato dimostrato che dal punto di vista della funzione endoteliale, un decremento importante e significativo della viscosità ematica non modifica in termini quantitativi la percentuale di dilatazione flusso-mediata (FMD) mediante la tecnica dell’iperemia reattiva (RH), determinando però una maggiore durata della stessa (15). Sebbene estensivamente utilizzata, la tecnica mediante RH rappresenta solo uno degli approcci usati per aumentare lo shear stress per la valutazione dell’FMD e il profilo di shear stress transitorio che questa tecnica elicita è atipico nella vita quotidiana (16). Un incremento sostenuto di shear stress rappresenta un’evenienza fisiologica più comune (16). L’esercizio mediante Hand-grip (HX) provoca un incremento dello shear stress a livello brachiale sostenuto ed intensità dipendente (17). Evidenze crescenti suggeriscono che profili di shear stress diversi sono responsabili di meccanismi di trasduzione differenti e che la risultante risposta all’FMD potrebbe fornire informazioni distinte o complementari sulla funzione endoteliale (18-19).

1. **Scopo dello studio**

Scopo del presente studio è analizzare le modifiche delle variabili emoreologiche, emodinamiche e metaboliche, in una popolazione di individui apparentemente sana ma con aumentato rischio di sviluppare Diabete Mellito. Mentre precedenti lavori reclutavano partecipanti con ipotetica predisposizione allo sviluppo del Diabete Mellito basata sulla sola familiarità per tale patologia, il presente studio includerà soggetti con un punteggio al questionario FindRisc superiore a 12. Tale questionario infatti, raccomandato dalla European Society of Cardiology e dalla European Association for the Study of Diabetes, è in grado di prevedere il rischio di sviluppare il Diabete Mellito di tipo 2 nei prossimi dieci anni(20).

Gli obiettivi del presente lavoro sono:

1. Stimare la prevalenza di individui appartenenti ad una popolazione apparentemente sana, con punteggio al FindRisc maggiore o uguale a 12. Identificare, all’interno di tale popolazione, la percentuale di individui con glicemia capillare alterata allo stick glicemico.
2. Valutare, attraverso effettuazione della curva da carico di glucosio (OGTT), la prevalenza di diabete, ridotta tolleranza ai carboidrati e normo-tolleranza ai carboidrati in questi soggetti. Nei tre gruppi di soggetti così individuati,saranno analizzatele variabili emoreologiche ed emodinamiche, anche in corso e successivamente ad OGTT.
3. Valutare, nelle tre categorie, gli effetti emoreologici ed emodinamici dell’emosottrazione ottenuta mediante donazione di sangue intero.
4. **Soggetti e metodi**

Il presente è uno studio osservazionale.

**3.1 Soggetti**

Parteciperanno allo studio donatori di sangue afferenti alle diverse sedi dell’AVIS Regione Calabria che abbiano le seguenti caratteristiche:

* sesso maschile e femminile
* età compresa tra i 18 e i 65 anni
* abituali donatori di sangue
* punteggio al FindRisc superiore o uguale a 12
* glicemia capillare al destrostick superiore o uguale a 100 mg/dl.

Per eliminare la possibile influenza di fattori di confusione in grado di modificare la viscosità ematica vengono esclusi dallo studio:

* soggetti precedentemente affetti da patologia epatica, renale, polmonare
* soggetti precedentemente affetti da patologia infiammatoria
  1. **Metodi**

Ai soggetti afferenti alle diverse sedi dell’AVIS Regione Calabria verrà somministrato, in sede di donazione, il questionario FindRisc. Ai donatori con un punteggio al Findrisc superiore o uguale a 12, prima della donazione ematica, verrà effettuata la misurazione della glicemia capillare. I donatori con valori di glicemia capillare superiori o uguali a 100 mg/dl verranno inclusi nel presente studio previa adeguata informazione circa le modalità di svolgimento dello stesso e dopo aver firmato il relativo consenso informato.

I partecipanti che avranno prestato il proprio consenso scritto riceveranno una valutazione cardiovascolare e metabolica 7-10 giorni circa prima della donazione di sangue, ed esattamente 48 ore dopo la stessa; si dovranno pertanto recare in entrambi i giorni di valutazione presso i nostri locali alle ore 8:00 del mattino a digiuno ed eseguiranno i seguenti esami:

* Esame clinico generale con misurazione di altezza, peso,circonferenza addominale, pressione arteriosa e calcolo del BMI;
* Curva da carico di glucosio (OGTT);
* EcoDoppler carotideo;
* EcoDoppler dell’arteria brachiale con valutazione della funzione endoteliale tramite analisi della dilatazione flusso mediata (FMD, flow mediated dilation).

I dati saranno raccolti su schede predisposte all’uopo.

# Tutti i soggetti inclusi nello studio verranno sottoposti ad un completo esame clinico in cui: l’altezza sarà misurata senza scarpe con l'approssimazione di 0,5 centimetri; il peso sarà misurato con i soggetti in abiti civili ordinari con l’approssimazione di 0,1 kg; il BMI verrà calcolato come il peso (in Kg) diviso per l'altezza (in m2); la circonferenza addominale verrà misurata a metà strada tra il margine costole inferiore e la cresta iliaca;la pressione sistolica e diastolica sarà misurata sul braccio destro con uno sfigmomanometro standardizzato dopo che il partecipante si sarà riposato per almeno 5 minuti. Il fumo di sigaretta e l’anamnesi farmacologica verranno indagati mediante questionario. Il sangue venoso per l’analisi di routine sarà raccolto in una provetta con EDTA ed un’aliquota verrà sierata e conservata per futuri dosaggi; il prelievo sarà eseguito la mattina a digiuno per evitare l'influenza di un aumento lipidico e glucidico postprandiale sui parametri emoreologici (21).Verrà prestata particolare attenzione al fine di evitare la stasi venosa, e il laccio emostatico dopo incannulamento della vena verrà immediatamente rimosso. La curva da carico di glucosio verrà effettuata secondo le raccomandazioni della World Health Organization (22).

# Lo studio vascolare sarà eseguito utilizzando un eco-Doppler Philips Affiniti 70 (Royal Philips Electronics, Olanda) dotato di una sonda lineare ad alta frequenza di 12-5 MHz e di un sistema che consente di registrare contemporaneamente l'elettrocardiogramma. I pazienti saranno studiati dopo 12 ore di digiuno. Sarà inoltre richiesto loro di astenersi dall'esercizio fisico e di non assumere caffeina la mattina dell'esecuzione dell'esame ecografico.

# Arterie carotidi: le arterie carotidi (comune, interna, esterna e bulbo carotideo) saranno insonorizzate con paziente in posizione supina, e collo in estensione ed in tre proiezioni: anteriore, laterale e posteriore. La presenza di placca sarà valutata in ogni distretto carotideo visualizzato. Sarà inoltre misurata la velocità di flusso sanguigno a livello della carotide interna. La placca verrà definita come una lesione focale maggiore di 0,5 mm o 50% del valore dello spessore circostante o un ispessimento focale > di 1,5 mm. La stenosi dell'arteria carotide interna sarà definita del 16-50%, quando per tutta la durata del ciclo cardiaco si saranno registrate turbolenze senza evidenza di un aumento della velocità del flusso ematico. La stenosi verrà definita > 50% quando oltre la turbolenza registrata per tutta la durata del ciclo, la velocità sistolica risulterà ≥140 cm/sec; occlusione dell'arteria carotide interna sarà definita come assenza di segnale doppler. I soggetti, indipendentemente dal grado di stenosi o presenza di placca, saranno classificati come aventi aterosclerosi carotidea (CA+), mentre i soggetti con esame normale saranno classificati come non aventi aterosclerosi carotidea (CA-). Durante l'esame saranno registrate immagini durante l'onda T del ciclo cardiaco, dell'arteria carotide comune nelle 3 proiezioni, per la determinazione off-line dello spessore medio-intimale (IMT).

# Misurazione dello spessore medio intimale o IMT: l'IMT sarà misurato sulla parete lontana (far wall) della carotide comune ad 1 cm dal bulbo carotideo, in un segmento lungo circa 1 cm e nelle 3 proiezioni anteriore, laterale e posteriore. Per l'analisi statistica verrà calcolata la media delle tre misurazioni (IMT medio) ed il valore massimo tra le due arterie carotidi comuni (IMT max). Lo spessore medio-intimale sarà definito come la distanza intercorrente tra l'interfaccia lume-intima e l'interfaccia media-avventizia. La risoluzione delle sonde non consente di definire il limite tre media ed avventizia.

# Funzione endoteliale mediante ischemia dell’avambraccio: verrà valutata a livello dell'arteria brachiale del braccio non dominante. L'arteria brachiale verrà insonorizzata a circa 3 cm dalla piega del gomito, in proiezione longitudinale. Saranno registrate le velocità del flusso ematico in basale e successivamente il diametro interno (ID) del vaso. L'ID verrà definito come la distanza tra il margine superiore dell'eco generata dall'interfaccia fra lume e intima della parete vicina (near wall) ed il margine superiore dell'eco generata dall'interfaccia fra lume ed intima della parete profonda (far wall) del vaso. Il diametro verrà misurato tre volte e durante l'onda T del ciclo cardiaco, il valore medio sarà utilizzato per l'analisi statistica. Dopo aver misurato diametro e velocità dell'arteria brachiale in basale, verrà effettuato il test di vasodilatazione flusso mediata (FMD). Per l'esecuzione del test un manicotto sarà posizionato a livello dell'avambraccio e gonfiato alla pressione di 240 mmHg per 5 minuti per creare ischemia. Al termine dei 5 minuti il manicotto sarà rapidamente sgonfiato. La caduta delle resistenze periferiche durante ischemia determina un rapido incremento della velocità del flusso ematico (iperemia reattiva) con conseguente stimolazione dell'endotelio e vasodilatazione flusso mediata. Il diametro dell'arteria brachiale verrà misurato non solo a 50 secondi dal termine dell'ischemia ma anche dopo 2 e 3 minuti. In base al tempo in cui verrà ottenuta la massima dilatazione, i soggetti saranno definiti come Early Dilators se la dilatazione avverrà 50 secondi dopo, Late Dilators se la vasodilatazione avverrà oltre i 50 secondi. I soggetti che non avranno affatto dilatato dopo ischemia saranno definiti come No Dilators. La vasodilatazione verrà espressa come percentuale di incremento del diametro dopo ischemia rispetto al diametro basale utilizzando la seguente formula (ID post ischemia-ID basale/ID basale) \* 100.

Funzione endoteliale mediante Hand-grip Exercise: Prima di iniziare la valutazione del FMD mediante HandGrip ai soggetti verrà chiesto di effettuare tre tentativi di contrazione massimale volontaria (CMV) mediante dinamometro T.K.K. 5401 GRIP-D, al fine di ottenere una media delle tre misurazioni. I soggetti quindi effettueranno una serie di contrazioni ritmiche mediante HandGrip, all’intensità prestabilita del 30% della CMV individuale, alternando due secondi di contrazione a tre di rilasciamento, per una durata complessiva di 6 minuti. Il diametro dell’arteria brachiale sarà monitorato in continuo durante lo svolgimento dell’esercizio e le misurazioni saranno effettuate nei seguenti tempi: 0 minuti, 1 minuto, 2 minuti, 3 minuti, 4 minuti, 5 minuti, 6 minuti (t0, t1, t2, t3, t4, t5, t6). L’incremento del diametro ai vari tempi sarà espresso come percentuale rispetto al diametro basale utilizzando la seguente formula:

FMD **=** [(IDtx- ID basale)/ID basale] x 100

**Bibliografia**

1. Cho YI, Mooney MP, Cho DJ. Hemorheological disorders in diabetes mellitus. J Diabetes Sci Technol. 2008 Nov;2:1130-8.
2. Skovborg F, Nielsen AV, Schlichtkrull J, Ditzel J. Blood-viscosity in diabetic patients. Lancet 1966;1:129–131.
3. Dintenfass L. Blood viscosity factors in severe non diabetic and diabetic retinopathy. Biorheology1977;14:151–157.
4. Schmid-Schὄnbein H, Volger E. Red-cell aggregation and red-cell deformability in diabetes. Diabetes 1976;25(Suppl. 2):897–902.
5. Tamariz LJ, Young JH, Pankow JS, Yeh HC, Schmidt MI, Astor B, Brancati FL. Blood viscosity and hematocrit as risk factors for type 2 diabetes mellitus: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Am J Epidemiol (2008); 168:1153-1160.
6. Guyton A, Hall J. Textbook of Medical Physiology. 10th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders Company, 2000, p. 212–213.
7. Stuart J, Kenny MW. Blood rheology. J ClinPathol1980;33:417–429.
8. Yang YJ, Hope ID, Ader M, Bergman RN. Insulin transport across capillaries is rate limiting for insulin action in dogs. J Clin Invest 1989;84:1620–1628.
9. Schultz TA, Lewis SB, Westbie DK, Wallin JD, Gerich JE. Glucose delivery: a modulator of glucose uptake in contracting skeletal muscle. Am J Physiol 1977;233:E514–E518.
10. Baron AD, Clark MG. Role of blood flow in the regulation of muscle glucose uptake. Annu Rev Nutr 1997;17:487–499.
11. Meiselman HJ, Merrill EW, Gilliland ER, Pelletier GA, Salzman EW. Influence of plasma osmolarity on the rheology of human blood. J Appl Physiol 1967;22:772–781.
12. Lowe GD, Lowe JM, Drummond MM, Reith S, Belch JJ, Kesson CM, Wylie A, Foulds WS, Forbes CD, MacCuish AC, Manderson WG. Blood viscosity in young male diabetics with and without retinopathy. Diabetologia 1980;18:359–363.
13. Irace C, Carallo C, Scavelli F, De Franceschi MS, Esposito T, Gnasso A. Blood viscosity in subjects with normoglycemia and prediabetes. Diabetes Care (2014 Feb); 37(2):488-492.
14. Gnasso A, Cacia M, Cortese C, Succurro E, Andreozzi F, Carallo C, Irace C. No effect on the short-term of a decrease in blood viscosity on insulin resistance. Clin Hemorheol Microcirc. 2018;68(1):45-50.
15. Gnasso A., Cacia M., Cutruzzolà A., Minieri M., Carallo C., Cortese C., Irace C. Influence of acute reduction of blood viscosity on endothelial function. Clin Hemorheol Microcirc. (*in press*)
16. J. C. Tremblay e K. E. Pyke. Flow-mediated dilation stimulated by sustained increases in shear stress: a useful tool for assessing endothelial function in humans? Am J Physiol Heart Circ Physiol,vol. 314, p. H508–H520, 2018.
17. B. Wu et al. The use of shear rate–diameter dose–response curves as an alternative to the flow-mediated dilation test. Medical Hypotheses 84 (2015) 85–90.
18. K. E. Pyke V. Poitras, and M. E. Tschakovsky. Brachial artery flow-mediated dilation during handgrip exercise: evidence for endothelial transduction of the mean shear stimulus Am J Physiol Heart Circ Physiol 294: H2669–H2679, 2008.
19. B. Findlay, P. Gupta, I. Szijgyarto e K. Pyke. Impaired brachial artery flow-mediated vasodilation in response to handgrip exercise-induced increases in shear stress in young smokers. Vasc Med*,* vol. 18, n. 2, pp. 63-71, 2013.
20. Lindström J, Tuomilehto J. The diabetes risk score: a practical tool to predict type 2 diabetes risk. Diabetes Care 2003;26:725-3.
21. Stamos TD, Rosenson RS. Low high density lipoprotein levels are associated with an elevated blood viscosity. Atherosclerosis 1999;146:161–165.
22. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. Report of a WHO/IDF consultation 2006.